Simplexa™ CMV

REF MOL2200
Rev. D

Ein Real-Time-PCR-Assay zur quantitativen *In-vitro*-Bestimmung des Cytomegalovirus (CMV).

***In-vitro*-Diagnostikum**

ANWENDUNGSBEREICH

Der Simplexa™ CMV-Assay von Focus Diagnostics dient der quantitativen *In-vitro*-Bestimmung der Nukleinsäuren des Cytomegalovirus (CMV) im Vollblut und/oder Plasma mit dem Integrated Cycler von 3M.

Dieser Assay ist für die Verwendung in Verbindung mit dem klinischen Bild sowie anderen Laborparametern des Krankheitsverlaufs als Hilfsmittel zur Behandlung und Kontrolle von mit CMV infizierten Patienten bestimmt.

Dieser Assay ist nicht zum Screening auf das Vorliegen von CMV in Blut oder Blutprodukten gedacht. Der Assay darf nur fachgerecht eingesetzt werden.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG

Das menschliche Cytomegalovirus (CMV) wird den menschlichen Herpesviren zugeordnet und ist ein Beta-Herpes-Virus.[1] CMV-Infektionen kommen in allen Bevölkerungen vor. Mindestens etwa 70 % aller Erwachsenen sind seropositiv auf CMV-Antikörper, was auf eine Infektion mit dem Virus in der Vergangenheit hinweist.

Primäre CMV-Infektionen sind bei ansonsten gesunden Personen asymptomatisch oder führen zu einer leichten unspezifischen Erkrankung. Bei Schwangeren kann eine primäre CMV-Infektion dagegen eine kongenitale Infektion des Fetus oder Neugeborenen zur Folge haben, und bei Empfängern von Organtransplantaten kann eine Primärinfektion zu ernsten Erkrankungen führen.[2, 3]

Wie alle Herpesviren ruft auch das CMV nach der akuten Infektion eine latente Infektion des Wirts hervor. Nach Immunsuppression oder anderen Erkrankungen kann es zu einer Reaktivierung des Virus kommen. Bei immungeschwächten Patienten ist das CMV eine anerkannte Ursache für Morbidität und Mortalität.[4] Voraussetzung für eine Präventivbehandlung bei Hochrisikopatienten ist eine Früherkennung der CMV-Replikation durch Messung des Virustiters. Wenn im Blut oder Plasma ein bestimmter Virustiter erreicht ist, bevor klinische Symptome auftreten, können eine antivirale Therapie oder Veränderungen der immunsuppressiven Behandlung indiziert sein. Ausschlaggebend für die effiziente und effektive Behandlung einer CMV-Infektion bei solchen Patienten nach der Diagnosestellung ist ein Test, mit dem sich das Vorhandensein von CMV in Blut und Plasma kontrollieren und quantifizieren lässt.[5, 6]

Der Simplexa™ CMV-Assay entspricht dem CMV-Standard der WHO[7]. Die Viruslast im Simplexa™ CMV-Assay wird in internationalen Einheiten (Units) pro Milliliter (IU/ml) angegeben.

GRUNDLAGEN DES VERFAHRENS

Bei dem Test handelt es sich um ein Real-Time-PCR-System zur Amplifikation und Detektion. Der DNA-Nachweis des Cytomegalovirus in Vollblut und Plasma erfolgt durch eine bifunktionelle fluoreszierende Primersonde. Der Test besteht im Wesentlichen aus zwei Schritten: (1) Extraktion von DNA aus Patientenproben, (2) Amplifizierung eines spezifischen Zielmoleküls (in jedem Analyt und der internen Kontrolle) mithilfe eines bifunktionellen fluoreszierenden Sondenprimers und eines Rückwärts-Primers. Der Assay liefert ein Ergebnis; die virale DNA in der Probe wird über eine gut konservierte Zielregion im UL83-Gen des CMV-Genoms identifiziert. Zur Überprüfung der Extraktion und zur Erkennung einer Hemmung der PCR wird eine interne Kontrolle mitgeführt. Das aus jeder Probe gewonnene Amplifikationssignal wird mit einer Kalibrierkurve verglichen und quantifiziert.

MITGELIEFERTES MATERIAL

Das Simplexa™ CMV-Kit von Focus Diagnostics enthält ausreichend Reagenzien für 100 Bestimmungen.

Beschreibung des Kits

Bezeichnung der Komponente	REF	EG-SYMBOL AUF ETIKETT		Kurzbezeichnung	Deckelfarbe	Anzahl Fläschchen	Reaktionen pro Gefäß/Kit	Volumen pro Fläschchen
Simplexa™ CMV Primer Mix	**MOL2201**	**REAG**	**A**	**PM**	Braun	2	50/100	50 µl
Simplexa™ Master Mix	**MOL2000**	**REAG**	**B**	**MM**	Grün	2	50/100	200 µl
Simplexa™ Extraction & Amplification Control DNA	**MOL9001**	**CONTROL**	**IC**	**IC**	Blau	3	50/150	250 µl
Simplexa™ CMV Low Positive Control	**MOL2202**	**CONTROL**	**+**	**LPC**	Weiß	6	1/6	200 µl
Simplexa™ CMV High Positive Control	**MOL2203**	**CONTROL**	**++**	**HPC**	Rot	6	1/6	200 µl

Beschreibung der Komponente

Komponente	Beschreibung
Simplexa™ CMV Primer Mix (PM) (Primer-Mix)	Mit fluoreszierendem Farbstoff markierte Primer, die CMV und die Interne DNA-Kontrolle spezifisch quantifizieren.
Simplexa™ Master Mix (MM) (Master-Mix)	DNA-Polymerase, Puffer und dNTPs
Simplexa™ Extraction & Amplification Control DNA (IC) (DNA für die Extraktions- und Amplifikationskontrolle)	Ein 577 Basenpaare umfassendes DNA-Fragment aus dem Gen, das die *N*-Methyltransferase der großen Untereinheit der Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase der Pflanze *Arabidopsis thaliana* kodiert.
Simplexa™ CMV Low Positive Control (LPC) (Niedrigpositiv-Kontrolle)	Inaktiviertes CMV in humaner Basismatrix.
Simplexa™ CMV High Positive Control (HPC) (Hochpositiv-Kontrolle)	Inaktiviertes CMV in humaner Basismatrix.
Simplexa™ CMV Barcode Card (Barcode-Karte)	Test-spezifische Parameter

Target	Sonden-Fluorophor (Farbstoff)	Exzitation	Emission	Zielgen
CMV	FAM	495 nm	520 nm	UL83-Gen
Interne Kontrolle	Q670	644 nm	670 nm	*A. thaliana-Gen*

ERFORDERLICHES, JEDOCH NICHT MITGELIEFERTES MATERIAL

1. Simplexa™ CMV Quantitation Standards REF MOL2210
2. 3M Integrated Cycler mit Integrated Cycler Studio-Software, Version 5.0 oder höher
3. Universal Discs zur Verwendung auf dem Integrated Cycler
4. Universal Disc Cover Tape
5. [a] Roche MagNA Pure LC System und zugehöriges Verbrauchsmaterial
6. [a] Roche MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit (Roche Kat.-Nr. 03038505001)
7. [b] NucliSENS® easyMAG™ Gerät von bioMérieux und dazugehörige(s) Verbrauchsmaterial und Reagenzien
8. [b] Biohit/bioMérieux Mehrkanalpipette
9. [b] ELISA-Streifenplatte
10. Ein-, Mehrkanalmikropipette(n) und/oder Repetiermikropipette(n) mit einem Genauigkeitsbereich von 1-10 µl, 10-100 µl und 100-1000 µl
11. Gefrierschrank, -10 °C bis -30 °C (mit manueller Abtaufunktion), für die Lagerung der gefrorenen Kit-Komponenten
12. Kühlschrank mit 2 °C bis 8 °C (für Proben und aufgetaute Kit-Komponenten)
13. Biologische Sicherheitswerkbank (Laminarflow-Haube) für die Durchführung der Extraktionen
14. Mikrozentrifuge
15. Vortex-Mischer
16. Sterile, RNase/DNase-freie Einmalpipettenspitzen mit Aerosolbarriere
17. 1,5 ml Polypropylen-Mikrozentrifugenröhrchen und Ständer (RNase-/DNase-freie Röhrchen werden empfohlen, sind aber nicht vorgeschrieben)
18. Einweg-Schutzhandschuhe (ungepudert)
19. Nukleasefreies Wasser (zur Extraktion und als Leerwert-Kontrolle (No-Template Control NTC))
20. Kühlständer für 1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen

[a] Zur Verwendung beim Roche MagNA Pure LC-Extraktionsverfahren
[b] Zur Verwendung beim bioMerieux easyMAG Extraktionsverfahren

HALTBARKEIT UND HANDHABUNG

1. Reagenzien bei -10 bis -30 ℃ aufbewahren (keine Gefriergeräte mit Abtauautomatik verwenden).

2. Reagenzien vor Gebrauch bei Raumtemperatur auftauen lassen (Temperaturbereich ca. 18 °C bis 25 °C).
3. Kits und Reagenzien nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwenden.
4. Das Reaktionsgemisch innerhalb einer Stunde nach Zubereitung verwenden. Das Reaktionsgemisch bei 2 °C bis 8 °C lagern, bis die PCR angesetzt werden kann.
5. Nach dem ersten Auftauen können Primer-Mix, Master-Mix und DNA für die Extraktions- und Amplifikationskontrolle maximal 30 Tage bei 2–8 °C aufbewahrt werden.
6. Primer-Mix, Master-Mix, DNA für die Extraktions- und Amplifikationskontrolle und Positivkontrollen nicht wieder einfrieren.
7. Keine Reagenzien aus verschiedenen Kitchargen kombinieren.

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

1. Alle Humanmaterialien sollten als potenziell infektiös behandelt werden. Das Ursprungsmaterial dieses Produktes (und der Kontrollen) ist mit US-FDA-anerkannten Methoden auf HBs-Antigen, Hepatitis C-Antikörper und HIV-1/2 (AIDS) Antikörper untersucht und für negativ befunden worden. Dennoch gewährleistet keine der bekannten Testmethoden absolute Garantie dafür, dass Produkte, die aus menschlichem Blut gewonnen wurden, die genannten oder andere infektiöse Krankheiten nicht übertragen können. Alle Kontrollen, Serumproben und Geräte, die in Kontakt mit den Proben kommen, sollten daher als potenziell infektiös angesehen und durch entsprechende biologische Sicherheitsmaßnahmen dekontaminiert oder entsorgt werden. Die amerikanischen CDC und National Institutes of Health empfehlen, dass potenziell infektiöse Materialien mit biologischer Sicherheitsstufe 2 gehandhabt werden.[8, 9]
2. Beim Umgang mit den Kit-Reagenzien persönliche Schutzausrüstung wie (jedoch nicht beschränkt auf) Handschuhe und Laborkittel tragen. Hände nach der Durchführung des Tests gründlich waschen.
3. Nicht mit dem Mund pipettieren.
4. In Bereichen, in denen Kit-Reagenzien und/oder Humanproben gehandhabt werden, darf nicht geraucht, getrunken und gegessen werden. In diesen Bereichen sollten auch keine Kontaktlinsen eingesetzt/herausgenommen und kein Make-up aufgetragen werden.
5. Nicht verwendete Kit-Reagenzien bzw. Humanproben gemäß den örtlichen und nationalen Bestimmungen entsorgen.
6. Der Arbeitsablauf im Labor sollte nur in einer Richtung erfolgen, ausgehend von den Prä-Amplifikationsbereich(en) in Richtung Amplifikations-/Detektionsbereich: Im folgenden Abschnitt wird der Ablauf der Arbeitsschritte von der Probenextraktion bis zur Amplifikation mittels Real-Time-PCR beschrieben:
   - Am Anfang steht die Probenextraktion, gefolgt von der Einstellung des Geräts zur Durchführung der Real-Time-PCR, der Zubereitung der Reagenzien und schließlich der Amplifikation mittels Echtzeit-PCR.
   - Verbrauchsmaterial oder Geräte sollten nicht zwischen den verschiedenen Bereichen ausgetauscht werden.
   - Verbrauchsmaterial und technische Ausstattung für die Probenvorbereitung dürfen nicht für die Reagenzienzubereitung oder zum Bearbeiten amplifizierter DNA oder anderer Quellen der Zielnukleinsäure verwendet werden.
   - Sämtliches Verbrauchsmaterial und sämtliche technischen Vorrichtungen für die Amplifikation müssen immer im Bereich des Real-Time-PCR-Geräts verbleiben.
   - Auch die persönliche Schutzausrüstung, wie z B. Laborkittel und Einmalhandschuhe, sollten bereichsspezifisch gehandhabt werden.
7. Die Kontamination von Reagenzien bzw. Patientenproben kann zu einer Verfälschung der Testergebnisse führen. Unter aseptischen Bedingungen arbeiten.
8. Die Reagenzien vorsichtig pipettieren und handhaben, um eine Kontamination mit Material aus benachbarten Kavitäten zu verhindern.
9. Geeignete Pipettiertechniken anwenden und für die Dauer des Tests das gleiche Pipettierschema einhalten, um optimale und reproduzierbare Werte zu erhalten.
10. Die Reagenzien nicht gegen Reagenzien anderer Kit-Chargen oder anderer Hersteller austauschen oder mit diesen mischen.
11. Die Verschlusskappen der Reagenzröhrchen nicht vertauschen. Dies könnte zur Kontamination führen und die Testergebnisse beeinträchtigen.
12. Nur das in diesem Beipackzettel beschriebene Protokoll verwenden. Bei Nichteinhaltung des Protokolls oder der angegebenen Zeiten sowie Temperaturen kann es zu fehlerhaften Testergebnissen kommen.
13. Der Testansatz sollte bei Raumtemperatur (Temperaturbereich ca. 18 °C bis 25 °C) erfolgen. Beim Mischen der Reagenzien die Enzyme durch einen Kühlblock gekühlt halten.
14. Universal Discs, die bereits in Kontakt mit Patientenproben oder Reagenzien gekommen sind, nicht wieder verwenden.
15. Gebrauchte Discs ohne Abnehmen der Abdeckfolie entsorgen.
16. Wenn verschiedene Simplexa™ Kits auf der gleichen Disc angesetzt werden, müssen die Positiv- und Leerwert-Kontrollen aus jedem verwendeten Kit getestet werden.
17. Der Master-Mix enthält >1 % Glycerin, welches bei Einatmen oder Hautkontakt zu Reizungen führen kann. Nach Einatmen oder Berührung sollten Erste-Hilfe-Maßnahmen eingeleitet werden. Bei der Handhabung von Chemikalien allgemeine

Sicherheitsrichtlinien befolgen. Dieses Produkt ist nach der Gefahrenstoffverordnung keinen Kennzeichnungsrichtlinien unterworfen.

18. Eine längere Aufbewahrung extrahierter Proben bei 2 °C bis 8 °C wird nicht empfohlen; die Leistung wurde unter diesen Bedingungen nicht geprüft.
19. Das Kit bei offensichtlich angebrochener oder beschädigter Verpackung bzw. angebrochenem oder beschädigtem Inhalt nicht verwenden und Focus Diagnostics kontaktieren. Kontaktadressen befinden sich auf der letzten Seite dieses Dokuments.

GEBRAUCHSANWEISUNG

A. PROBENGEWINNUNG

Als Probe kommt durch Venenpunktion gewonnenes Vollblut oder Plasma zum Einsatz. Keine Probenröhrchen mit Heparin als Antikoagulans verwenden. Heparin inhibiert die PCR.

B. PROBENEXTRAKTIONSBEREICH

In einem speziellen, der Extraktion von Proben und Kontrollen vorbehaltenen Bereich arbeiten. Die Vorbereitung der Proben für die Extraktion wird auf einer biologischen Sicherheitswerkbank durchgeführt.

Extraktion mit dem MagNA Pure LC-Extraktionsverfahren von Roche

1. Die Extraktion von Nukleinsäuren aus Patientenproben und Assaykontrollen erfolgt mit dem Roche MagNA Pure Total Nucleic Acid Isolation-Kit und dem Roche MagNA Pure LC Automated Nucleic Acid Extractor-Gerät. Hinsichtlich der Nukleinsäureextraktion mit diesem Kit die Gebrauchsanweisungen des Herstellers beachten.
2. Im Dropdownmenü „Protocol“ (Protokoll) des MagNA Pure LC-Systems die Optionen „Total NA“ (Gesamtzahl der Nukleinsäuren) und anschließend „Total NA Variable_elution_volume.blk“ wählen. Damit werden die passenden Einstellungen für den Lauf geladen.
3. Das Probenprotokoll sollte „Total NA Variable_elution_volume“ sein.
4. Als Probenvolumen sollte 200 µl und als Elutionsvolumen 50 µl eingestellt sein.
5. Das Verdünnungsvolumen sollte für alle Proben auf Null eingestellt sein.
6. Das „Post Elution Protocol“ muss auf „None“ (Keine) eingestellt sein.
7. Darauf achten, dass Proben und Kontrollen sich auf der Probenkartusche an der richtigen Position befinden.
8. Jede Probe, Niedrigpositiv- und Hochpositiv-Kontrolle 2-4 Sekunden vortexen und kurz zentrifugieren, um die Inhaltsstoffe auf den Boden des Röhrchens zu ziehen.
9. 200 µl von jeder Probe, Niedrig- und Hochpositiv-Kontrolle sowie Leerwert-Kontrolle in die entsprechende Position der Probenkartusche pipettieren.
10. Den Füllpegel der Proben und Kontrollen in der Probenkartusche einer Sichtprüfung unterziehen, um sicherzustellen, dass Probe(n) zugegeben wurde(n).
11. Die DNA zur Extraktions- und Amplifikationskontrolle zweimal pulsvortexen und kurz zentrifugieren, um die Inhaltsstoffe auf den Boden des Röhrchens zu ziehen.
12. Für je 16 Proben (1-16 Proben) 100 µl der (IC) in 6 ml Lysepuffer in ein konisches Röhrchen pipettieren. Kurz auf dem Vortex mischen. In das entsprechende Fach des MagNA Pure Extraktionsgerätes geben.
    - Werden beispielsweise mehr als 16 Proben (17-32 Proben) extrahiert, müssen 200 µl der IC in 12 ml Lysepufferlösung in ein konisches Röhrchen pipettiert werden. Kurz auf dem Vortex mischen. In das entsprechende Fach des MagNA Pure Extraktionsgerätes geben.
13. Die Probenkartusche in das MagNA Pure LC Automated Nucleic Acid-Extraktionsgerät überführen und die Extraktion starten.
14. Nach Abschluss der Nukleinsäureextraktion kann die Kartusche mit den extrahierten Kontrollen und Patientenproben aus dem MagNA Pure-Extraktor herausgenommen und verschlossen werden. Die extrahierte DNA vor der Verwendung bei 2 °C bis 8 °C aufbewahren. Die Langzeitlagerung extrahierter Proben bei dieser Temperatur wird nicht empfohlen. Extrahierte DNA-Proben beim Laden der Disc auf einem Kühlblock aufbewahren.

Extraktion mit dem NucliSENS® easyMAG™-Extraktionsverfahren von bioMérieux

1. Zur Bedienung von Gerät und Software ist das Benutzerhandbuch des NucliSENS® easyMAG™ zu beachten.
2. In der NucliSENS® easyMAG™ Software die Vorlage „Generic“ (Allgemein) mit folgenden Einstellungen wählen:

Default Request (Standardanfrage):	Generic 2.0.1 (or equivalent) (oder äquivalent)
Run Name Prefix (Anfangskode der Laufbezeichnung:	(as appropriate) (beliebig)
Sample ID prefix (Anfangskode der Proben-ID):	(as appropriate) (beliebig)
Sample Type (Probentyp):	Primary (Primär)
Workflow Defaults (Standardarbeitsabläufe):	On-board lysis Incubation (Lyse-Inkubation im Gerät) On-board Silica Incubation (Inkubation mit Silica im Gerät) Sample Addition Guidance Off (Hinweise zur Zugabe von Proben Aus)
Reagent Tracking (Rückverfolgung der Reagenzien):	Lysis, Silica, Internal Control reagent tracking disabled (Rückverfolgung von Lyse-Reagenz, Silica und interner Kontrolle deaktiviert)

3. Die individuellen Probendaten in der Bildschirmmaske „Extraction Request“ (Extraktionsanforderung) wie folgt eingeben:

Sample ID (Proben-ID):	(Enter sample name)(Probenbezeichnung eingeben)
Request (Anfrage):	Generic 2.0.1 (or equivalent) (oder äquivalent)
Volume (Volumen) (mL):	0,200
Eluate (Eluat) (µL):	50
Type (Typ):	Primary (Primär)
Priority (Priorität):	Normal
Matrix:	Other (Sonstige)

4. Nach den Angaben im Benutzerhandbuch in der NucliSENS® easyMAG™ Software einen „Extraction Run“ (Extraktionslauf) erstellen.
5. Jede Probe, Niedrigpositiv- und Hochpositiv-Kontrolle 2-4 Sekunden vortexen und kurz zentrifugieren, um die Inhaltsstoffe auf den Boden des Röhrchens zu ziehen.
6. 200 µl der Probe, der Niedrig-/Hochpositiv- und der Leerwert-Kontrolle in Probengefäße pipettieren.
7. Die interne Kontrolle zweimal (2x) pulsvortexen und kurz zentrifugieren, um die Inhaltsstoffe auf den Boden des Röhrchens zu ziehen.
8. In jede Proben- und Kontroll-Kavität 5 µl interne Kontrolle pipettieren. Zwischen den Proben die Pipettenspitze wechseln.
9. Nach den Angaben im Benutzerhandbuch das/die Probengefäß(e), neue Verbrauchsmaterialien für den Aspirator und die Reagenzien in das easyMAG™ Gerät laden.
10. Die Lyse im Gerät starten und die lysierten Proben 10 Minuten inkubieren, bevor das magnetische Silica-Gemisch zugegeben wird.
11. Das magnetische Silica-Gemisch während der Lyse-Inkubation vorbereiten. Silica mischen und mit nukleasefreiem Wasser verdünnen, indem 1 Teil magnetisches Silica zu 3 Teilen nukleasefreiem Wasser gegeben wird (z. B. 270 µl magnetisches Silica + 810 µl nukleasefreies Wasser). Je Probe mindestens 135 µl magnetisches Silica-Gemisch vorbereiten.
12. Zum Übertragen des Silica-Gemisches in die Kavitäten der ELISA-Streifen das magnetische Silica-Gemisch anmischen und 1 Spitze sowie den Betriebsmodus P2 der Biohit-Pipette verwenden. Auf **Start** drücken, um 1050 µl des magnetischen Silica-Gemisches anzusaugen, und nochmals auf **Start** drücken, um das erste Volumen zurück in das Röhrchen mit Silica-Gemisch auszuwerfen. Auf **Start** drücken, um 125 µl des magnetischen Silica-Gemisches in 8 einzelne Kavitäten des ELISA-Streifens zu pipettieren. Bedarfsweise für weitere ELISA-Streifen wiederholen.
13. Nach der 10-minütigen Lyseinkubation 8 Spitzen (je ELISA-Streifen) und den Betriebsmodus P3 der Biohit-Pipette verwenden, um jeder Probe in dem Probengefäß 100 µl des magnetischen Silica-Gemisches zuzusetzen. Die Spitzen in die Kavitäten der ELISA-Streifen geben und **Start** drücken, um das magnetische Silica-Gemisch zu mischen und anzusaugen.
14. Das magnetische Silica-Gemisch in das jeweilige Probengefäß geben und die Pipettenspitze(n) in die Proben eintauchen. Sie sollten sich unterhalb des Flüssigkeitsspiegels befinden. Auf **Start** drücken, um das magnetische Silica anzusaugen, zu pipettieren und mit den Proben zu mischen (3x). Die Pipettenspitzen müssen unterhalb des Flüssigkeitsspiegels bleiben, damit der Mischvorgang korrekt ausgeführt wird.
15. Für jedes weitere Probengefäß Schritt 13 und 14 wiederholen.
16. Nach Zugabe des magnetischen Silica-Gemisches zu allen Probengefäßen den Extraktionslauf starten.
17. Nach Abschluss des Laufs das (die) Probengefäß(e) aus dem Gerät nehmen. Werden die Proben nicht sofort weiterverarbeitet, sind sie in individuelle Röhrchen zu überführen, um das Risiko, dass magnetisches Silica zurück in die Probe fällt, zu minimieren. Die extrahierte DNA bis zum Gebrauch bei 2 °C bis 8 °C aufbewahren. Die Langzeitlagerung extrahierter Proben bei dieser Temperatur wird nicht empfohlen. Extrahierte DNA-Proben beim Beschicken der Disc auf einem Kühlblock aufbewahren.

C. EINSTELLUNG DES GERÄTS FÜR DIE REAL-TIME-PCR

1. Einzelheiten darüber, wie die Integrated Cycler Studio Software zu konfigurieren ist, um eine Assaydefinition hinzuzufügen, einen Lauf einzustellen und die Läufe auf dem Integrated Cycler zu analysieren, sind der Bedienungsanleitung des Integrated Cycler zu entnehmen.

Hinweis: Vor Durchführung eines Vorhersagelaufes muss eine valide Standardkurve (Kalibrierungslauf) eingerichtet werden.

D. REAGENZIENZUBEREITUNGSBEREICH

Ein für die Vorbereitung des Reaktionsgemisches für den Simplexa™ CMV-Assay reservierter Bereich.

1. Primer-Mix und Master-Mix bei Raumtemperatur (etwa 18°C bis 25 °C) auftauen. Jedes Röhrchen im Kit enthält eine für 50 Reaktionen ausreichende Reagenzienmenge. Vor jedem Gebrauch Primer Mix- und Master Mix-Komponenten vorsichtig durchmischen und kurz zentrifugieren, um die Inhaltsstoffe auf den Boden des Röhrchens zu ziehen.
2. In ein Polypropylen-Mikrozentrifugenröhrchen entsprechender Größe jede Komponente in dem in der folgenden Tabelle angegebenen Volumen pipettieren, um das erforderliche Volumen des Reaktionsgemisches zuzubereiten.

Reaktionsgemischvolumen

Reagens	Reaktionsgemisch-Volumen / 1 Reaktion	Reaktionsgemisch-Volumen / 10 Reaktionen
Simplexa™ Master Mix	4,0 µl	40 µl
Simplexa™ CMV Primer Mix	1,0 µl	10 µl
Gesamtvolumen	5,0 µl	50 µl

3. Das Reaktionsgemisch durch 8- bis 10-maliges Pipettieren vorsichtig mischen.
4. Kurz zentrifugieren, um die Inhaltsstoffe auf den Boden des Röhrchens zu ziehen.
5. Mit der Vorbereitung der PCR fortfahren.
6. Das Reaktionsgemisch innerhalb einer Stunde nach Zubereitung verwenden. Sofern die PCR-Vorbereitung nicht sofort nach dem Ansetzen des Reaktionsgemisches erfolgt, sollte dieses bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden.

E. BEREICH FÜR DIE REAL-TIME-PCR-AMPLIFIKATION

In einem speziellen, der Vorbereitung der Universal Disc mit 96 Kavitäten für den Simplexa™ CMV-Assay vorbehaltenen Bereich arbeiten.

1. In jede Kavität 5,0 µl des Reaktionsgemischs pipettieren.
2. 5,0 µl der extrahierten Positivkontrollen in die Kavitäten „HPC“ und „LPC“ pipettieren.
3. 5,0 µl der extrahierten Patientenprobe in die entsprechende Kavität „S“ pipettieren.
4. 5,0 µl der extrahierten Leerwert-Kontrolle in die Kavität “NTC” pipettieren.
5. Die Disc mit dem Universal Disc Cover Tape abdecken.
6. Den Deckel des Integrated Cycler öffnen.
7. Die verschlossene Universal Disc auf die Platte legen.
8. Den Deckel vorsichtig schließen.
9. Auf **Run** (Lauf) klicken.
10. Auf **Start** klicken.

F. DATENANALYSE

1. Einzelheiten zur Durchführung der Datenanalyse und zum Exportieren der Analysen, sofern dies erforderlich ist, sind der Bedienungsanleitung des Integrated Cycler zu entnehmen.

QUALITÄTSKONTROLLE

Jedes Labor sollte, ausgehend von den vor Ort geltenden Gesetzen, Bestimmungen und der üblichen guten Laborpraxis eigene Qualitätskontrollbereiche wie auch die Häufigkeit der Qualitätskontrollen ermitteln.

ERSTELLUNG VON ERGEBNISBERICHTEN

1. Laufvalidität

   Durch Überprüfung der CMV- und IC-Ergebnisse für die Niedrigpositiv-Kontrolle (LPC), Hochpositiv-Kontrolle (HPC) und Leerwert-Kontrolle (NTC) die Validität des Laufs ermitteln. Damit der Lauf als valide gilt, müssen alle drei Kontrollen die Akzeptanzkriterien erfüllen. Bei ungültigem Lauf müssen alle Patientenproben erneut getestet werden.

Akzeptanzkriterien

Kontrolle	CMV	DNA für die Extraktions- und Amplifikationskontrolle (IC)
No Template Control (NTC)	Not Detected (Nicht detektiert)	Detected (Detektiert)
Low Positive Control (LPC)	Innerhalb des Toleranzwertes auf dem chargenspezifischen Etikett	nicht zutreffend
High Positive Control (HPC)	Innerhalb des Toleranzwertes auf dem chargenspezifischen Etikett	nicht zutreffend

- Der Leerwert (NTC) entspricht den Akzeptanzkriterien, falls kein CMV detektiert und die interne Kontrolle (IC) nachgewiesen wurde. Die Detektion von CMV in der NTC zeigt an, dass die Proben möglicherweise während der Verarbeitung kontaminiert wurden.
- Die Niedrigpositiv-Kontrolle (LPC) erfüllt die Akzeptanzkriterien, falls die in der LPC detektierte CMV-Konzentration innerhalb der Toleranzgrenzen (wie auf dem chargenspezifischen Etikett angegeben) liegt. Die IC sollte nachgewiesen werden, dies ist aber nicht zwingend erforderlich.
- Die Hochpositiv-Kontrolle (HPC) erfüllt die Akzeptanzkriterien, falls die in der HPC detektierte CMV-Konzentration innerhalb der Toleranzgrenzen (wie auf dem chargenspezifischen Etikett angegeben) liegt. Die IC sollte nachgewiesen werden, dies ist aber nicht zwingend erforderlich.

2. Interpretation der Ergebnisse

Interpretation der Ergebnisse

Beispiel	CMV-Wert	IC-Wert*	Interpretation
1	Not Detected (Nicht detektiert)	Detected (Detektiert)	CMV nicht detektiert
2	< 713 IU/ml	n. z.	CMV detektiert, unterhalb LLoQ (quantitative Untergrenze)
3	X IU/ml	n. z.	CMV-Nachweis in der bestimmten Konzentration
4	> 3,96 x 10^8 IU/ml	n. z.	CMV detektiert, oberhalb ULoQ (quantitative Obergrenze)
5	Not Detected (Nicht detektiert)	Not Detected (Nicht detektiert)	Ungültig, erneut extrahieren und Test wiederholen

3. Validität der Probenergebnisse

   Eine Probe ist valide, falls entweder

   1. kein CMV detektiert und die IC nachgewiesen wurde oder
   2. CMV detektiert wird. Bei CMV-positiven Ergebnissen muss die interne Kontrolle nicht unbedingt nachgewiesen werden.
   3. Die Amplifikationskurven aller Ergebnisse sind zu überprüfen, insbesondere wenn eine „Data Quality“-Meldung (Datenqualität) vorliegt. Eine gültige Amplifikationskurve zeigt einen glatten exponentiellen Anstieg. Weitere Einzelheiten dazu finden sich im Benutzerhandbuch.

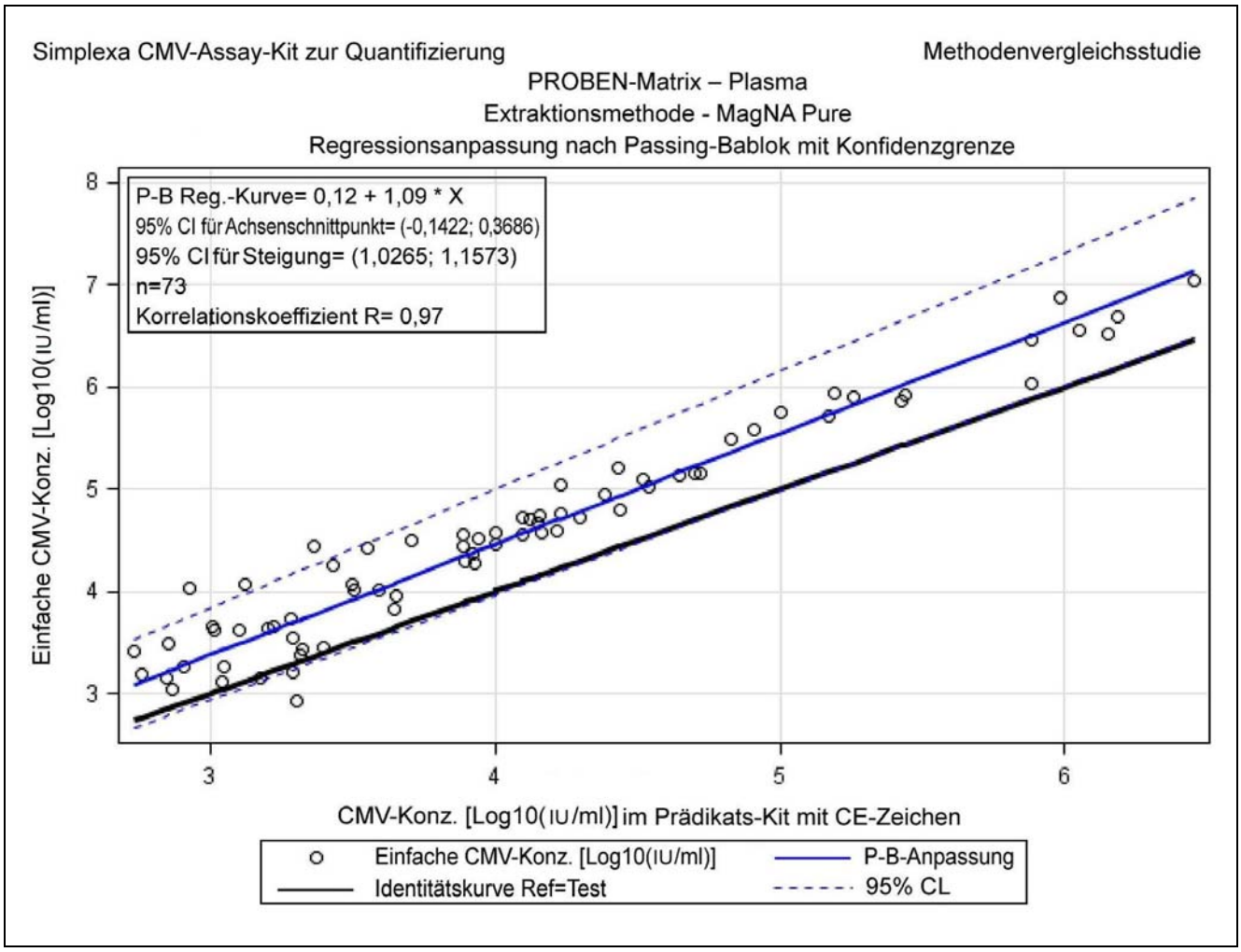
EINSCHRÄNKUNGEN

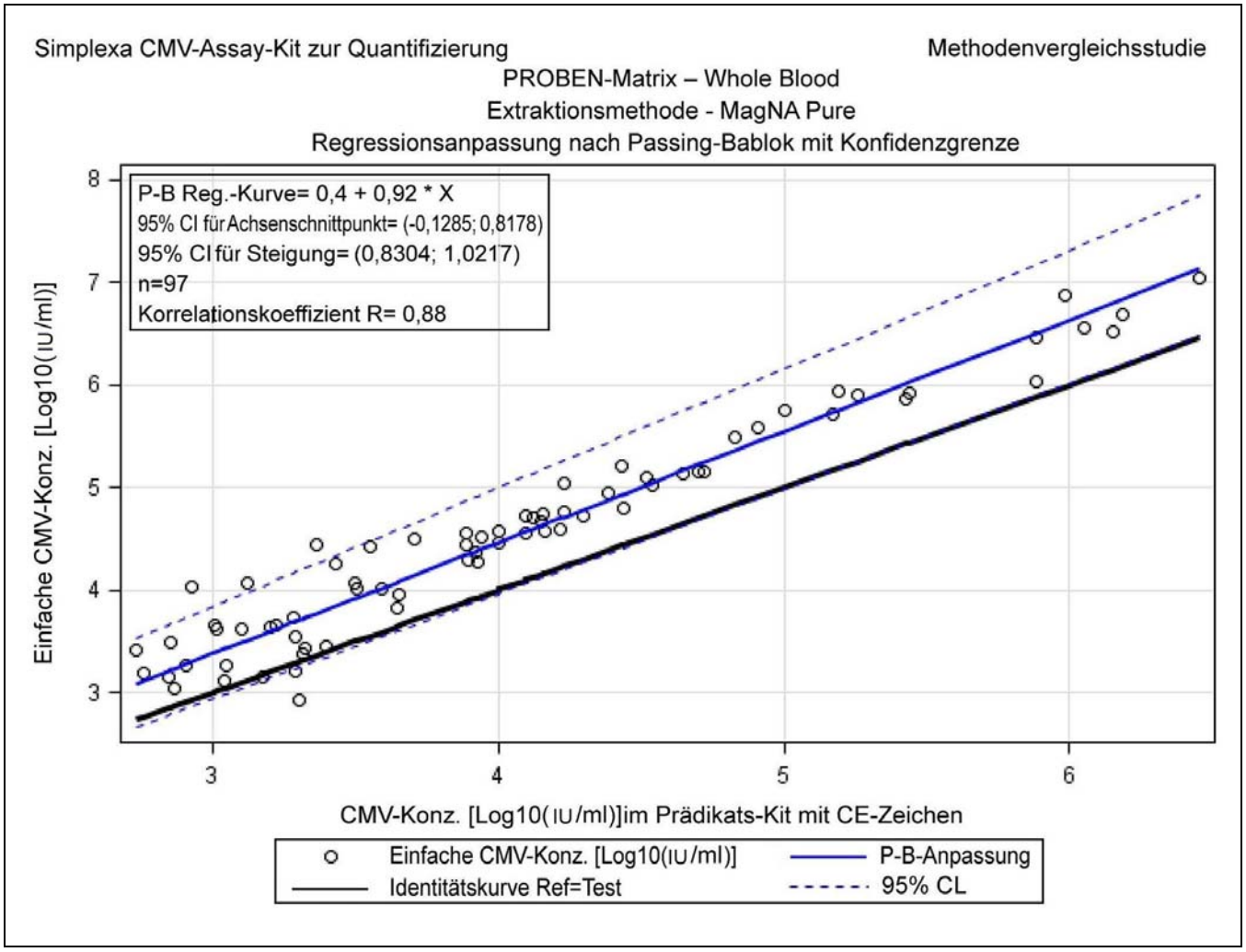
1. *In-vitro*-Diagnostikum.
2. Nur für den Export bestimmt.
3. Die Personen, die die Analyse durchführen, sollten sich vor Durchführung des Assays eingehend mit den Testverfahren und der Ergebnisinterpretation vertraut gemacht haben.
4. Zur Quantifizierung unbekannter Patientenproben speichert die 3M Integrated Cycler Studio-Software die letzte gültige Kalibrierungsdatei. Die Quantifizierungsstandards und Patientenproben müssen mit der identischen Methodik extrahiert werden, da es ansonsten zu fehlerhaften Testergebnissen kommen kann.
5. Bei der Überwachung eines Patienten muss bei allen Bestimmungen dasselbe Extraktionsverfahren verwendet werden, da die Ergebnisse sonst nicht vergleichbar sind.
6. Alle Testergebnisse aus diesen und anderen Tests müssen im Zusammenhang mit der klinischen Anamnese, den epidemiologischen Daten und allen anderen Daten, die dem zuständigen Arzt vorliegen, gesehen werden.
7. Die Prävalenz der Infektion beeinflusst den prädiktiven Wert des Assays.
8. Wie bei anderen Tests auch, schließt ein negatives Ergebnis eine CMV-Infektion nicht aus.
9. Ein falsch negatives Ergebnis kann dadurch zustande kommen, dass beim Erreger neue Genommutationen, Insertionen, Deletionen oder Rearrangements aufgetreten sind.
10. Falsch negative Ergebnisse können auftreten, wenn in der Probe aufgrund einer niedrigen Viruslast, aufgrund eines erst frühen Stadiums der Erkrankung oder aufgrund von Fehlern bei Entnahme, Transport oder Handhabung zu wenig Erreger vorhanden sind.
11. Wie bei anderen Testverfahren kann es auch hier zu falsch positiven Ergebnissen kommen. Eine Wiederholung des Tests oder die Durchführung des Tests mit einem anderen Gerät könnte in manchen Fällen indiziert sein.
12. Die Leistung dieses Assays wurde nicht für das Screening von Blut oder Blutprodukten auf das Vorliegen von CMV bestimmt.
13. Dieser Assay kann keine Erkrankung ausschließen, die durch andere bakterielle oder virale Erreger verursacht wird.

SPEZIFISCHE LEISTUNGSDATEN

METHODENVERGLEICH

Anhand einer linearen Regressionsanalyse nach Passing-Bablok im gesamten Linearitätsbereich wurde ein Vergleich mit einem Prädikatstest mit CE-Zeichen durchgeführt. Die Berechnung der Parameter der linearen Regression (Steigung & Achsenschnittpunkt) mit einem 95%-Konfidenzintervall erfolgte nach dem Passing-Bablok-Verfahren.





REPRODUZIERBARKEIT

Mit einem Panel aus künstlichen Plasma- und Vollblutproben, denen verschiedene Konzentrationen eines CMV-Stammes zugesetzt worden waren, wurden Reproduzierbarkeitsstudien durchgeführt. Das Probenpanel umfasste in jeder Matrix eine negative (nicht beimpfte), eine schwach positive (ca. 2–4x Nachweisgrenze), eine mäßig positive (ca. 8–10x Nachweisgrenze) und eine hoch positive (nahe an der oberen Nachweisgrenze des Assays) Probe. Weiterhin umfasste die Probengruppe für jeden Quantifizierungspegel einen CMV-Quantifizierungsstandard-Satz (QS; n=5) aus einer einzigen Charge, der als „unbekannt“ zu testen war.

Dasselbe Probenpanel (n=13) enthielt die Niedrigpositiv-Kontrolle (LPC), die Hochpositiv-Kontrolle (HPC) und die Leerwert-Kontrolle (NTC) und wurde einmal täglich von jedem Anwender mit dem MagNA Pure LC-Gerät und dem MagNA Pure Total Nucleic Acid Isolation-Kit sowie dem NucliSENS easyMAG™-System unter Verwendung der entsprechenden Reagenzien extrahiert. Das Probenpanel von DNA-Extrakten wurde dann in vierfacher Ausführung auf dem Integrated Cycler-Gerät getestet. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Quantitative Reproduzierbarkeit - QCMV												
Standardabweichung Komponenten												
Probentyp	Probenbezeichnung	Extraktionsverfahren	Erwarteter Konzentrationspegel (IU/ml)	Erwarteter Konzentrationspegel Log (IU/ml)	Beobachteter geometrischer Mittelwert (IU/ml)	Beobachteter Log-Mittelwert (IU/ml)	Anzahl der Messergebnisse	Von System zu System	Von Tag zu Tag	Von Lauf zu Lauf	Innerhalb eines Laufs	Gesamt
KONTROLLEN	HPC	MagNA Pure	2,00E+06	6,301	2,00E+06	6,300	80	0,060	0,000	0,056	0,029	0,087
		easy MAG			2,53E+06	6,402	80	0,022	0,039	0,042	0,016	0,064
	LPC	MagNA Pure	2,00E+04	4,301	2,00E+04	4,301	80	0,000	0,000	0,090	0,066	0,112
		easy MAG			2,14E+04	4,330	80	0,000	0,024	0,045	0,037	0,063
PLASMA	REPRO 6	MagNA Pure	5,00E+07	7,699	1,05E+08	8,021	80	0,048	0,034	0,064	0,023	0,090
		easy MAG			3,19E+08	8,504	72	0,000	0,053	0,050	0,026	0,077
	REPRO 7	MagNA Pure	7,10E+03	3,851	9,72E+03	3,988	80	0,094	0,033	0,063	0,063	0,133
		easy MAG			3,42E+04	4,534	80	0,000	0,033	0,069	0,036	0,084
	REPRO 8	MagNA Pure	2,84E+03	3,453	3,11E+03	3,493	80	0,121	0,042	0,000	0,150	0,197
		easy MAG			1,26E+04	4,099	80	0,000	0,000	0,065	0,036	0,075
QS	REPRO 2	MagNA Pure	2,05E+07	7,312	2,18E+07	7,338	80	0,000	0,000	0,056	0,020	0,059
		easy MAG			2,02E+07	7,305	80	0,011	0,018	0,023	0,015	0,035
	REPRO 3	MagNA Pure	2,10E+05	5,322	2,24E+05	5,351	80	0,000	0,000	0,046	0,025	0,053
		easy MAG			2,06E+05	5,313	80	0,013	0,000	0,027	0,023	0,037
	REPRO 4	MagNA Pure	1,87E+04	4,272	2,15E+04	4,333	80	0,047	0,000	0,040	0,079	0,100
		easy MAG			1,91E+04	4,282	80	0,000	0,000	0,029	0,047	0,055
	REPRO 5	MagNA Pure	4,74E+03	3,676	4,25E+03	3,629	80	0,000	0,000	0,000	0,138	0,138
		easy MAG			5,13E+03	3,710	80	0,000	0,022	0,029	0,088	0,095
VOLLBLUT)	REPRO 10	MagNA Pure	7,10E+03	3,851	1,47E+04	4,168	80	0,085	0,000	0,090	0,069	0,142
		easy MAG			4,08E+03	3,611	77	0,060	0,071	**0,322**	0,093	**0,348**
	REPRO 11	MagNA Pure	2,84E+03	3,453	5,97E+03	3,776	80	0,069	0,000	0,099	0,101	0,157
		easy MAG			2,23E+03	3,348	73	0,126	0,118	0,162	0,117	0,264
	REPRO 9	MagNA Pure	5,00E+07	7,699	1,22E+08	8,087	80	0,083	0,068	0,066	0,038	0,132
		easy MAG			3,78E+07	7,578	80	0,137	0,000	0,231	0,016	0,269

NTC, negatives Plasma, negatives Vollblut und ein Quantifizierungsstandard wurden als Teil des Probenpanels zur Ermittlung der Reproduzierbarkeit analysiert. Alle Tests mit diesen Proben waren reproduzierbar, wenngleich nicht im Messbereich des Assays, und wurden daher nicht bei der quantitativen Reproduzierbarkeit berücksichtigt.

ANALYSEEMPFINDLICHKEIT / NACHWEISGRENZE

Die für diese Studie verwendeten LoD-Proben setzten sich aus einem Stamm mit bekannter Bestandskonzentration, der einer klinisch negativen Plasma- bzw. Vollblutmatrix zugesetzt wurde, zusammen. Das Probenpanel umfasste eine Negativprobe (nicht beimpfte Probenmatrix) und Proben mit unterschiedlicher CMV-Konzentration im Bereich der ungefähren Nachweisgrenze (ermittelt im Rahmen von Verifizierungstests).

Die Studie bestand aus mehreren Analysen zur Evaluierung der Nachweisgrenze des experimentellen Simplexa™ CMV-Kits unter Verwendung von zwei Extraktionsmethoden.

Zur Bestimmung der Nachweisgrenze wurden 3 getrennte Extraktionen und PCR-Läufe durchgeführt. Jede extrahierte Probe wurde in achtfacher Ausführung (eine Extraktion, 8 Kavitäten) zusammen mit Assaykontrollen (Einzelbestimmungen) getestet. Von jedem Element des Panels wurden daher insgesamt 24 Replikate getestet. Die Nachweisgrenze (Limit of Detection, LoD) entspricht der niedrigsten Konzentration, die eine Nachweisrate ≥ 95 % ergibt. Das Protokoll zur Bestimmung der Nachweisgrenze wurde für jeden Probentyp mit jeder der beiden Extraktionsmethoden ausgeführt. Die einzelnen LoD-Werte sind in der untenstehenden Tabelle aufgeführt. Die LoD für den CMV-Assay entspricht der höchsten der für alle Probentypen und Extraktionsmethoden ermittelten LoDs und betrug 711 IU/ml.

	Plasma		Vollblut	
	MagNA Pure	**EasyMag**	**MagNA Pure**	**EasyMag**
IU/ml	**711**	**99***	**568**	**585**
Kopien/ml	**180**	**25***	**145**	**148**

* Die Nachweisgrenze für diesen Probentyp entspricht der niedrigsten Konzentration, bei der > 95 % von 24 Replikaten positiv getestet wurden.

UNTERE QUANTIFIZIERUNGSGRENZE (LLoQ)

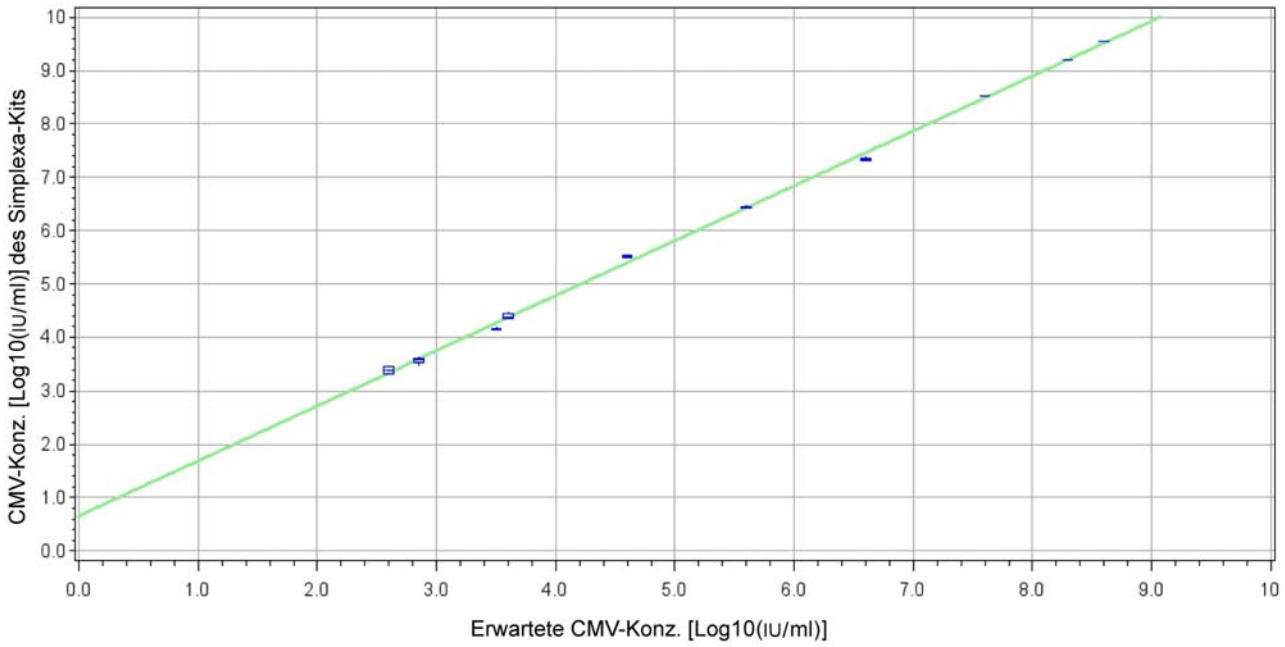
Die untere Quantifizierungsgrenze (LloQ, Lower Limit of Quantification) wurde definiert als die niedrigste Konzentration, bei der die Standardabweichung für alle Probentypen und Extraktionsmethoden ≤ 0,3 log IU/ml betrug. Die untere LLoQ lag bei 713 IU/ml.

LINEARITÄT

Die Bestimmung der Linearität erfolgte unter Verwendung von Proben, die sich aus einem Stamm mit bekannter Bestandskonzentration, der einer klinisch negativen Plasma- bzw. Vollblutmatrix zugesetzt wurde, zusammensetzten. Die Probengruppe umfasste mindestens 10 Pools bekannter Kopienzahl über den erwarteten linearen Bereich. Von den Pools lagen mindestens 3 Pools von der Konzentration her an der quantitativen Untergrenze (Lower Limit of Quantitation, LLoQ), 2 lagen an der quantitativen Obergrenze (Upper Limit of Quantitation, ULoQ) und die verbleibenden Pools verteilten sich gleichmäßig zwischen der LLOQ und der ULOQ. Jede Probe wurde im Zufallsverfahren in mindestens 3 Replikaten getestet. Das Protokoll zur Bestimmung der Linearität wurde für jeden Probentyp mit jeder der beiden Extraktionsmethoden ausgeführt. Die einzelnen Werte für den linearen Bereich sind in der untenstehenden Tabelle aufgeführt.

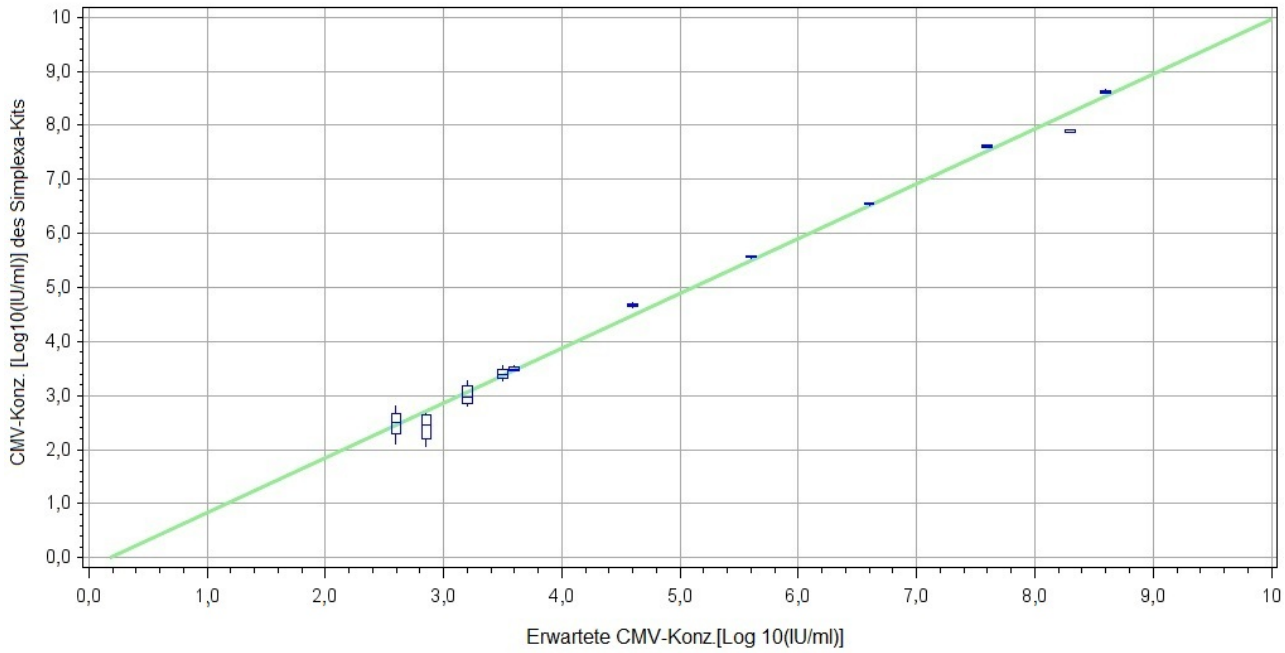
	Plasma		Vollblut	
	MagNA Pure	**EasyMag**	**MagNA Pure**	**EasyMag**
IU/ml	713 bis 3,96 × 10^8	396 bis 3,96 × 10^8	396 bis 3,96 × 10^8	396 bis 3,96 × 10^8
Kopien/ml	180 bis 1,00 × 10^8	100 bis 1,00 × 10^8	100 bis 1,00 × 10^8	100 bis 1,00 × 10^8

Linearitätskurve für Plasma bei easyMAG-Extraktion



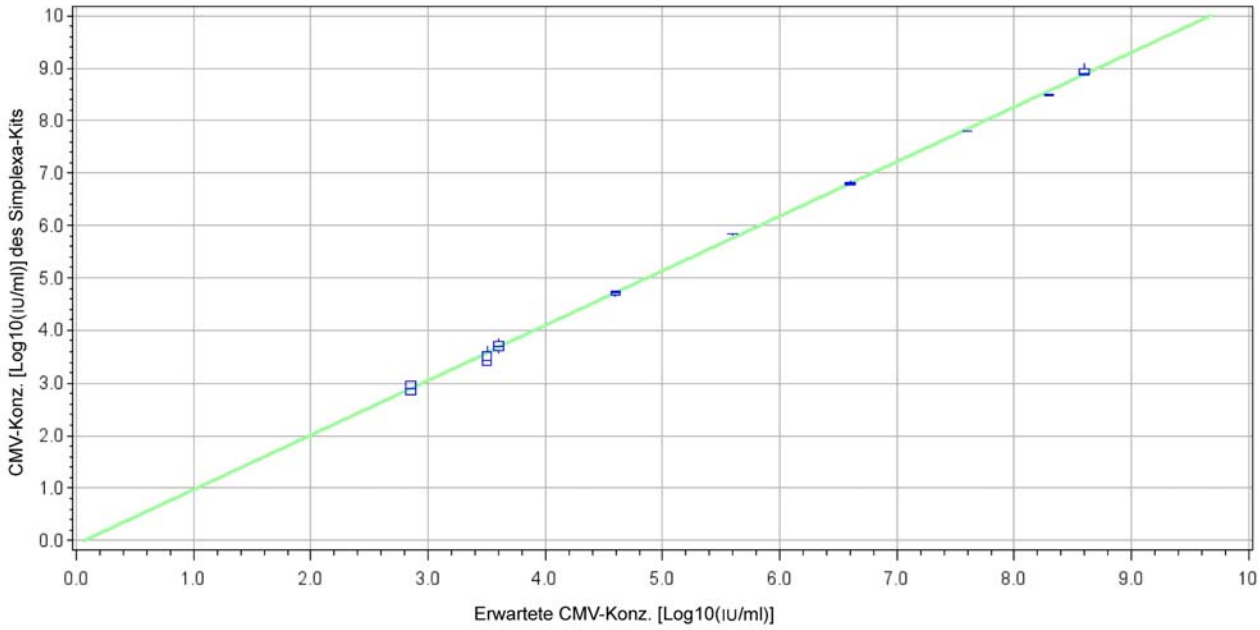
Regressionsgleichung:
Log_Simplexa_CMV = 0,6536 + 1,031096*Log_Erwartet_CMV

Linearitätskurve für Vollblut bei easyMAG-Extraktion



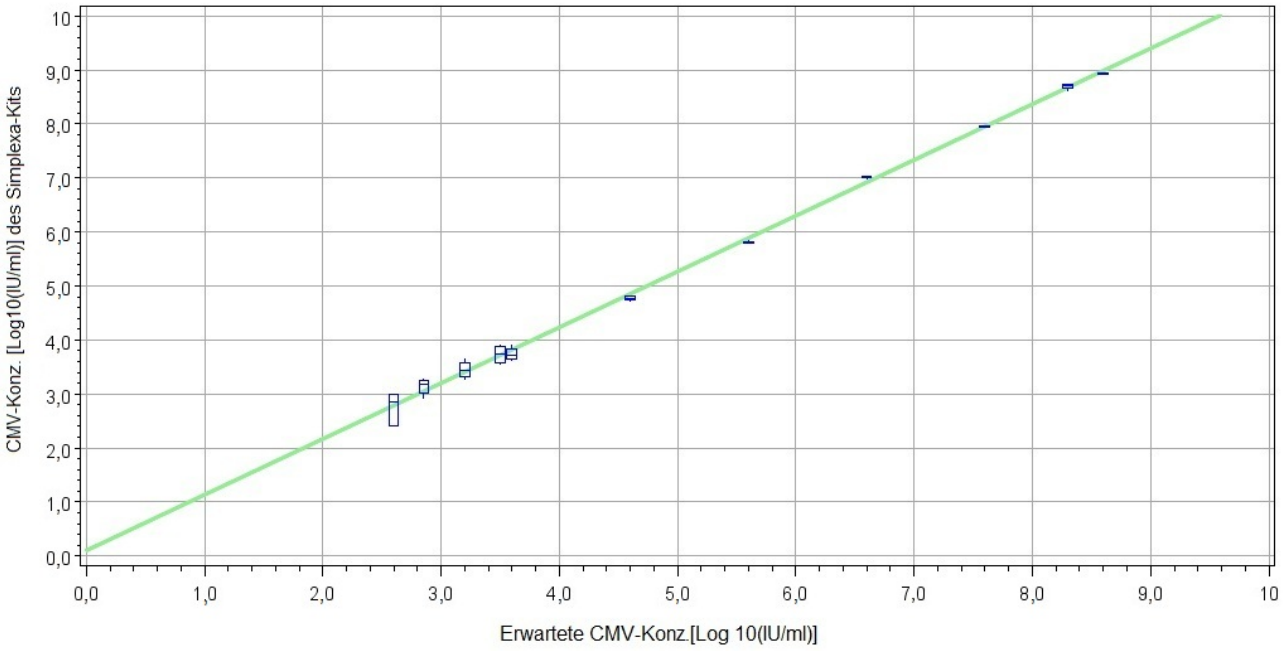
Regressionsgleichung:
Log_Simplexa_CMV = -0,193615 + 1,014454*Log_ Erwartet _CMV

Linearitätskurve für Plasma bei MagNA Pure-Extraktion



Regressionsgleichung:
Log_Simplexa_CMV = -0,07904 + 1,04182*Log_Erwartet_CMV

Linearitätskurve für Vollblut bei MagNA Pure-Extraktion



Regressionsgleichung:
Log_Simplexa_CMV = 0,101316 + 1,032461*Log_Erwartet_CMV

MESSBEREICH

Alle Extraktionsmethoden und Probentypen waren bis $\leq 3{,}96 \times 10^8$ IU/ml linear. Die Untergrenze des Messbereichs des Assays basiert auf dem Probentyp und der Extraktionsmethode, die den höchsten im linearen Bereich liegenden Wert für die untere LLoQ in IU/ml ergab. Damit liegt der Messbereich des Assays zwischen $\geq$ 713 IU/ml und $\leq 3{,}96 \times 10^8$ IU/ml. Proben mit Konzentrationen oberhalb des linearen Bereiches werden als $> 3{,}96 \times 10^8$ IU/ml ausgewiesen und Proben unterhalb des linearen Bereiches als < 713 IU/ml.

ANALYTISCHE REAKTIVITÄT / KREUZREAKTIVITÄT

Es wurde eine Untersuchung der analytischen Spezifität/Kreuzreaktivität des Simplexa™-Assays durchgeführt. Den Studien zufolge sind die Primer CMV-spezifisch und sind mit anderen Viren oder Bakterien, die ähnliche klinische Symptome hervorrufen oder in der normalen Flora der relevanten Probentypen vorkommen, nicht kreuzreaktiv. Von jedem möglicherweise kreuzreaktiven Erreger wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt.

Erreger (Plasma)	Ergebnis	Erreger (Vollblut)	Ergebnis
HBV (unverdünntes Kontrollmaterial)	Not Detected (Nicht detektiert)	n.z.	n.z.
HCV (unverdünntes Kontrollmaterial)	Not Detected (Nicht detektiert)	n.z.	n.z.
Adenovirus	Not Detected (Nicht detektiert)	Adenovirus	Not Detected (Nicht detektiert)
HIV-1	Not Detected (Nicht detektiert)	HIV-1	Not Detected (Nicht detektiert)
HIV-2	Not Detected (Nicht detektiert)	HIV-2	Not Detected (Nicht detektiert)
HSV-1	Not Detected (Nicht detektiert)	HSV-1	Not Detected (Nicht detektiert)
HSV-2	Not Detected (Nicht detektiert)	HSV-2	Not Detected (Nicht detektiert)
HHV-6	Not Detected (Nicht detektiert)	HHV-6	Not Detected (Nicht detektiert)
JCV	Not Detected (Nicht detektiert)	JCV	Not Detected (Nicht detektiert)
HHV-7	Not Detected (Nicht detektiert)	HHV-7	Not Detected (Nicht detektiert)
HHV=8	Not Detected (Nicht detektiert)	HHV-8	Not Detected (Nicht detektiert)
Rubella	Not Detected (Nicht detektiert)	Rubella	Not Detected (Nicht detektiert)
Parvovirus	Not Detected (Nicht detektiert)	Parvovirus	Not Detected (Nicht detektiert)
Toxoplasma gondii	Not Detected (Nicht detektiert)	Toxoplasma gondii	Not Detected (Nicht detektiert)
VZV	Not Detected (Nicht detektiert)	VZV	Not Detected (Nicht detektiert)
EBV	Not Detected (Nicht detektiert)	EBV	Not Detected (Nicht detektiert)
HTLV-1	Not Detected (Nicht detektiert)	HTLV-1	Not Detected (Nicht detektiert)

INTERFERENZ

Der Simplexa™ CMV-Assay erkennt CMV-DNA auch im Beisein möglicher Störsubstanzen spezifisch. Als Störsubstanzen wurde solche Substanzen erachtet, die in Patientenproben vorhanden sein können, exogene Stoffe, die in Proben möglicherweise vorhanden sind, oder Substanzen, die bei der Probengewinnung verwendet werden. Für den Zweck der Studie wurden der negativen Vollblut- und Plasma-Matrix CMV und Störsubstanzen zugesetzt. Folgende Störsubstanzen wurden untersucht: Azathioprin, Cyclosporin, Ganciclovir, Hydroxychloroquin Prednison, Abacavir, Efavirenz und Darunavir. Es wurde keine Interferenz beobachtet.

KONTAMINIERUNG DURCH VERSCHLEPPUNG

Die Amplifikation von Verschleppungen wurde mit anderen Assays für das Gerät und die Universal Disc ermittelt. Die Studien zielten darauf ab, Kontaminationen in hoch negativen Proben festzustellen. Die Studie bestand daraus, eine hoch positive und eine hoch negative Probe abwechselnd auf jeder Disc zu platzieren. Der Verschleppungseffekt wurde durch Vergleich der beobachteten Negativrate für die hoch negative Probe mit der erwarteten Rate unter normalen Bedingungen der Testwiederholung bestimmt. In den bisherigen Untersuchungen wurde keine signifikante Kontamination durch Verschleppung festgestellt.

LITERATUR

1. Mocarski, E. S. (1993) Cytomegalovirus biology and replication, p 173-226 In B. Roizman, R. J. Whitley, and C. Lopez (ed), the Human Herpesviruses. Raven Press, New York, N.Y.
2. Fowler KB, Stagno S, Pass RF, Britt WJ, Boll TJ, Alford CA. The outcome of congenital cytomegalovirus infection in relation to maternal antibody status. N Engl J Med. 1992 Mar 5;326(10):663-7.
3. Grundy JE, Lui SF, Super M, Berry NJ, Sweny P, Fernando ON, Moorhead J, Griffiths PD. Symptomatic cytomegalovirus infection in seropositive kidney recipients: reinfection with donor virus rather than reactivation of recipient virus. Lancet. 1988 Jul 16;2(8603):132-5.
4. Griffiths, P. D. and Emery, V.C. (2002) Cytomegalovirus, S. 433-461 In D. D. Richman, R. J. Whitley und F. G. Hayden (Hrsg.), Clinical Virology, Zweite Auflage. ASM Press, Washington, D.C.
5. Kalpoe, J. S., et al. oder (A. C. M. Kroes, M. D. de Jong, J. Schinkel, C. S. de Brouwer, M. F. C. Beersma und E. C. J. Claas) (2004) Validation of Clinical Application of Cytomegalovirus Plasma DNA Load Measurement and Definition of Treatment Criteria by Analysis of Correlation to Antigen Detection S. 1498–1504 Vol. 42, Nr. 4 JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY
6. Baldanti F, Lilleri D, Gerna G. Monitoring human cytomegalovirus infection in transplant recipients. J Clin Virol. 2008;41(3):237-41.
7. Fryer JF. Heath AB, Anderson R, Minor PD and the collaborative study group. Collaborative study to evaluate the proposed 1st WHO International Standard for human cytomegalovirus (HCMV) for nucleic acid amplification (NAT)-based assays. WHO ECBS Report 2010; WHO/BS/10.2138.
8. NCCLS H18-A2. Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens; Approved Guideline. 2. Auflage (1999).
9. CDC-NIH Manual. (1999) Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. 4. Aufl. und National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of Laboratory Workers from Instruments, Biohazards and Infectious Disease Transmitted by Blood, Body Fluids and Tissue (NCCLS M29-A).

Die Anwendung von Scorpions®-Sonden für Zwecke in Zusammenhang mit der *In-vitro*-Diagnostik beim Menschen ist durch eine Lizenz geschützt, die Focus Diagnostics, Inc. von DxS, Ltd. erworben hat. Die Farbstoffe Black Hole Quencher™, CAL Fluor™ und Quasar™ sind Marken der Biosearch Technologies, Inc. („BTI"). Die Black Hole Quencher, CAL Fluor- und Quasar-Farbstofftechnologie ist im Rahmen eines Vertrags mit BTI lizenziert, und diese Produkte werden ausschließlich für klinische, diagnostische oder Forschungs- und Entwicklungszwecke verkauft.

Dieser Beipackzettel ist auf www.focusdx.com in Französisch, Deutsch, Italienisch, Spanisch und brasilianischem Portugiesisch verfügbar. Versionen in anderen Sprachen sind möglicherweise bei Ihrem lokalen Vertriebspartner verfügbar.

VERTRIEB DURCH:
mdi Europa GmbH, Langenhagener Str. 71 30855, Langenhagen-Hannover, Deutschland

BESTELLINFORMATIONEN

Telefon:	**800-838-4548 (nur USA)**	**562-240-6500 (International)**
Fax:	**562-240-6510**	

TECHNISCHE HILFE

Telefon:	800-838-4548 (nur USA)	562-240-6500 (International)
Fax:	562-240-6526	

Besuchen Sie unsere Webseite: www.focusdx.com

CE 0344
PI.MOL2200.OUS
Rev. D
Erstellungsdatum: 22. April 2013

FOCUS Diagnostics
Cypress, Kalifornien 90630 USA